

Buone pratiche per l'uso delle linee cellulari

Opuscolo informativo realizzato da:

- Barbara Parodi, Centro Risorse Biologiche IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova; Gruppo Biotecnologie Sanitarie Comitato Tecnico Scientifico Biomedicina, malattie rare e malattie senza diagnosi A.Li.Sa., project manager BBMRI.it
- Paola Visconti, Banca cellule ICLC, responsabile Assicurazione qualità Centro Risorse Biologiche IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Common service qualità BBMRI.it
- Federica Parodi, Banca cellule ICLC, Centro Risorse Biologiche IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Common service qualità BBMRI.it
- Francesca Tardanico, studentessa Laurea specialistica in Biologia molecolare sanitaria, Università degli Studi di Genova, tirocinante presso Banca cellule ICLC
- Rodolfo Quarto, Scuola di Scienze mediche e farmaceutiche Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES), Università di Genova
- Rosa Bellomo, Biomedicina e patologie a bassa prevalenza - Area Dipartimentale Sanitaria A.Li.Sa. Regione Liguria

Breve storia delle linee cellulari

Sviluppare una nuova linea cellulare

Acquisire linee cellulari

Spedire le linee cellulari

Master Bank, Working Bank

Serial banking e backup

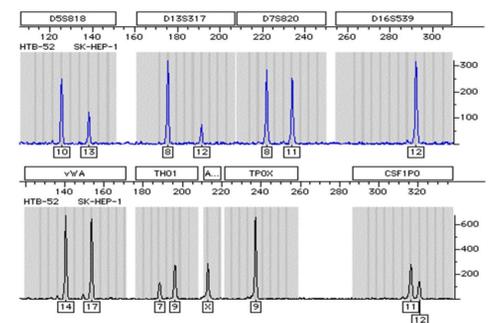
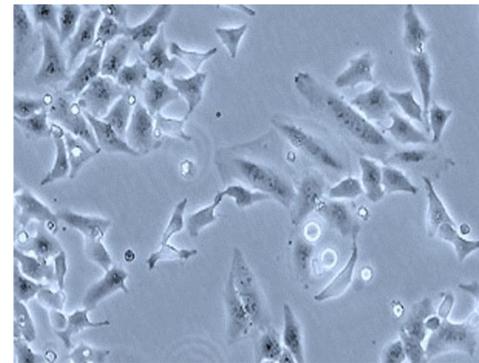
Autenticazione

Profilo STR

ICLAC e check list linee cellulari

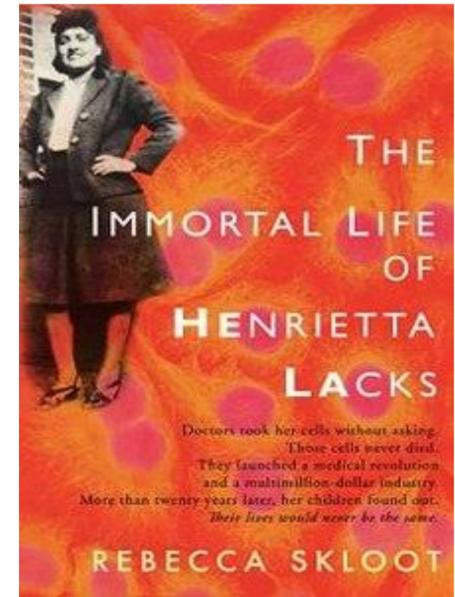
Banche di dati e di cellule

Referenze e approfondimenti

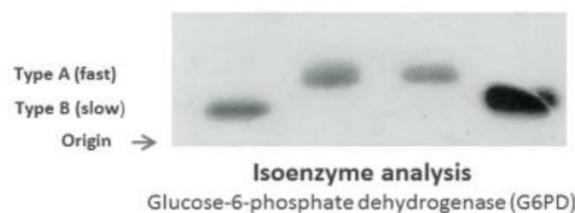
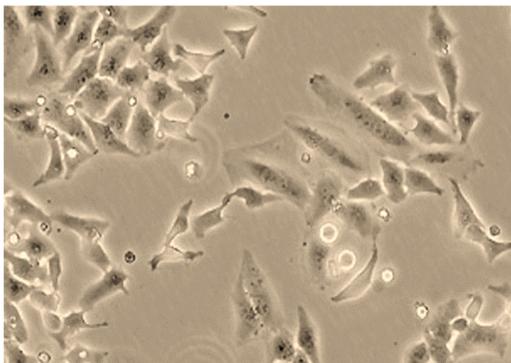


Breve storia delle linee cellulari

Mentre Henrietta Lacks é in cura alla *Johns Hopkins University* nel 1951, il dottor George Gey sta allestendo il primo laboratorio di colture cellulari, finalizzato «all'isolamento e al mantenimento di tessuti normali e maligni o altrimenti patologici, in forma di organoidi temporanei o stabili o come ceppi cellulari derivati»¹. Subito dopo Gey mette in coltura le HeLa cells, derivate dal tumore della cervice uterina di Henrietta Lacks.



Nel 1967 Stanley Gartler testa 20 linee cellulari ATCC attraverso l'analisi delle isoforme dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD): 18 linee su 20 risultano contaminate da HeLa (G6PD variante A)²



Dr. Stanley Gartler

Name	Description	ATCC® No.	Origin	G6PD variant
HeLa	Cervical adenocarcinoma, human	CCL-2™	African	Type A (fast)
KB	Oral epidermoid carcinoma, human	CCL-17™	Caucasian	Type A (fast)
HEp-2	Larynx epidermoid carcinoma, human	CCL-23™	Caucasian	Type A (fast)
Chang liver	Liver, human	CCL-13™	Caucasian	Type A (fast)
Int-407	Embryonic intestine, human	CCL-6™	Caucasian	Type A (fast)

Conclusion: 90% (18/20) human cell lines are 'HeLa'

Gartler SM, NCI Monogr. 26:176, 1967; Gartler, SM, Nature 217:750, 1968.



Negli anni '60 le linee cellulari sono coltivate sul banco del laboratorio, i terreni e i sieri non sono ben definiti, non esistono la plasticheria usa e getta e la cappa a flusso laminare, le competenze sulla crioconservazione sono limitate.

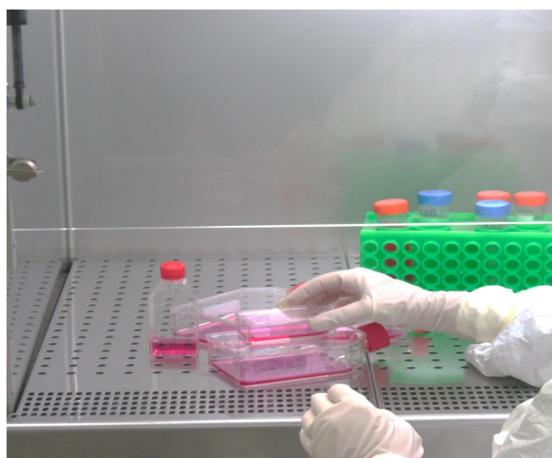
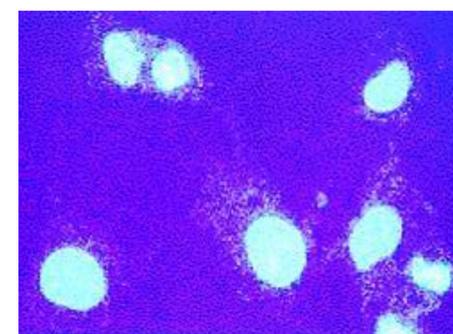
Oggi dovremmo aver risolto il problema, ma ...

... la comunità scientifica è ancora alle prese con contaminazione e scarsa qualità delle linee cellulari

Sviluppare una nuova linea cellulare

Quando si sviluppa una nuova linea cellulare da un campione biologico umano è necessario:

- ottenere il consenso informato del donatore, specifico per l'attività di ricerca e conforme al Regolamento UE General Data Protection Regulation³
- confermare, se pertinente, l'origine patologica del tessuto e conservarne una piccola porzione e un campione di sangue o tessuto normale di controllo per la successiva autenticazione della linea
- attribuire il nome alla linea secondo le indicazioni ICLAC⁴ (non troppo breve, informativo, protezione dell'anonimato, verifica su Cellosaurus⁵ se esiste già una linea con quel nome)
- non usare antibiotici per le colture
- escludere la presenza di micoplasma con almeno due test
- conservare immagini delle cellule a diversi passaggi



- registrare le informazioni relative al paziente:
 - età, sesso, stile di vita
 - stadio della patologia, storia clinica, marcatori tumorali
 - natura e sito d'origine del campione biologico, rapporto dell'analisi istopatologica
 - evidenza del consenso

- mantenere un registro completo ed accurato delle informazioni sulla linea cellulare:
 - tipo di cellule, modalità con cui è stata generata ed è mantenuta in coltura, densità di piastratura, tasso di crescita, numero di passaggi
 - codici e numeri di lotto di terreni di coltura e reagenti
 - controlli di qualità e caratterizzazione
 - processo di manipolazione genetica per i MOGM e sorgenti delle cellule di origine per gli ibridomi

In poche parole...

... leggere e mettere in pratica le
*Good Cell Culture Practices*⁶

Acquisire linee cellulari

Accesso, QC

- Verificare le restrizioni legali sull'uso (brevetti, Material Transfer Agreement)
- Controllare il nome rispetto al database ICLAC di linee cellulari non correttamente identificate⁷
- Tenere conto che non c'è nessuna garanzia di autenticità della linea se non certificata da una banca cellule riconosciuta

Le culture non dovrebbero essere passate da un laboratorio all'altro in modo incontrollato

Analisi del rischio

- Tenere presente che la linea cellulare può contenere agenti patogeni
- Controllare la contaminazione microbica prima dell'accettazione ed escludere la contaminazione da micoplasma
- Tenere conto che le linee cellulari umane coltivate in animali possono aver acquisito retrovirus competenti alla replicazione

Autenticazione e caratterizzazione

- Confermare l'autenticità della linea con il profilo STR
- Verificare le caratteristiche chiave
- Fare il cariotipo
- Registrare tempo di duplicazione e passaggi

Verificare sempre l'autenticità della linea, anche se proviene da una fonte «sicura»



Quarantena

- Sarebbe opportuno disporre di un laboratorio dedicato per le linee non ancora verificate
- Se non è disponibile, utilizzare cappa biohazard e incubatore dedicati
- In ogni caso, applicare le procedure operative standard (SOPs)

Spedire le linee cellulari

È obbligatorio, per le attività di imballaggio, gestione della documentazione, spedizione e trasporto di materiali pericolosi un formale **addestramento** da parte di un centro autorizzato, sui requisiti relativi alla manipolazione di materiali pericolosi (merci pericolose):

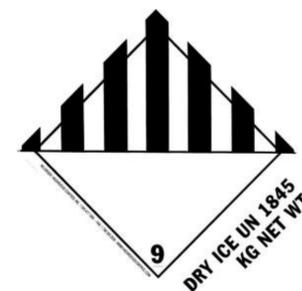
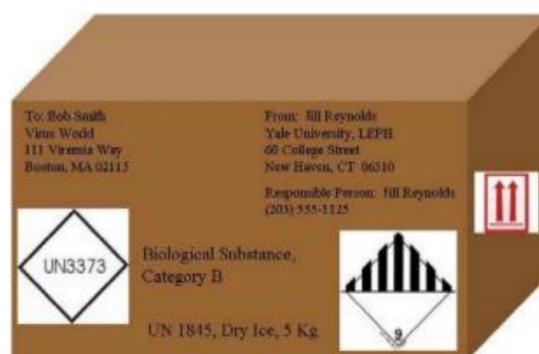
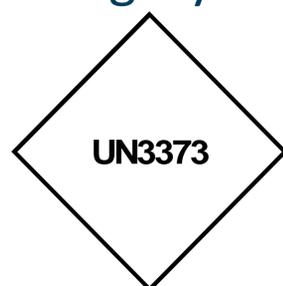
- classificazione di merci pericolose
- ghiaccio secco, azoto liquido
- classificazione dei materiali biologici
- requisiti di imballaggio e triplo imballo
- marchi ed etichette
- documentazione e registrazione richieste

Il certificato di addestramento è valido due anni

Category & UN #	Potential for Harm	Examples
A UN 2814 (human pathogens) UN 2900 (animal pathogens)	High	Human or animal pathogens that are cultured or amplified, such as cultures, stocks, or slants of infectious materials or genetically modified organisms or microorganisms meeting the definition of an infectious substance (e.g. recombinant VSV lab strains). Also included are diagnostic or clinical specimens containing a Risk Group 4 agent or a Select Agent. See Appendix 2 for a complete list of these high risk agents.
B UN 3373	Moderate	Biological substances, such as diagnostic or clinical specimens from humans or animals that are known to harbor a pathogen or have a high probability of containing a pathogen. Genetically Modified Organisms or Microorganisms that are "defective" but can still "alter a cell" (e.g. defective pathogen vectors, such as adenovirus, herpesvirus, retrovirus, AAV, etc.) Biological substances containing or having a high probability of containing a Risk Group 4 agent or a Select Agent cannot be shipped as a Category B infectious substance.
Exempt Human or Animal Specimen No UN#	Low	Biological substances that are not known to harbor a pathogen or that have lower probability of containing a pathogen. Most of the general human and animal specimens in research and diagnostic facilities will fall in this category.

Il ghiaccio secco è classificato dalla International Air Transport Association (IATA)⁸ come materiale pericoloso (UN 1845, classe 9). Cinque-otto Kg di ghiaccio secco in un contenitore isotermico in EPS di spessore 5 cm garantiscono per circa 72 ore una temperatura adeguata.

Le linee cellulari sono prevalentemente classificate come «Biological substance UN3373 Category B»



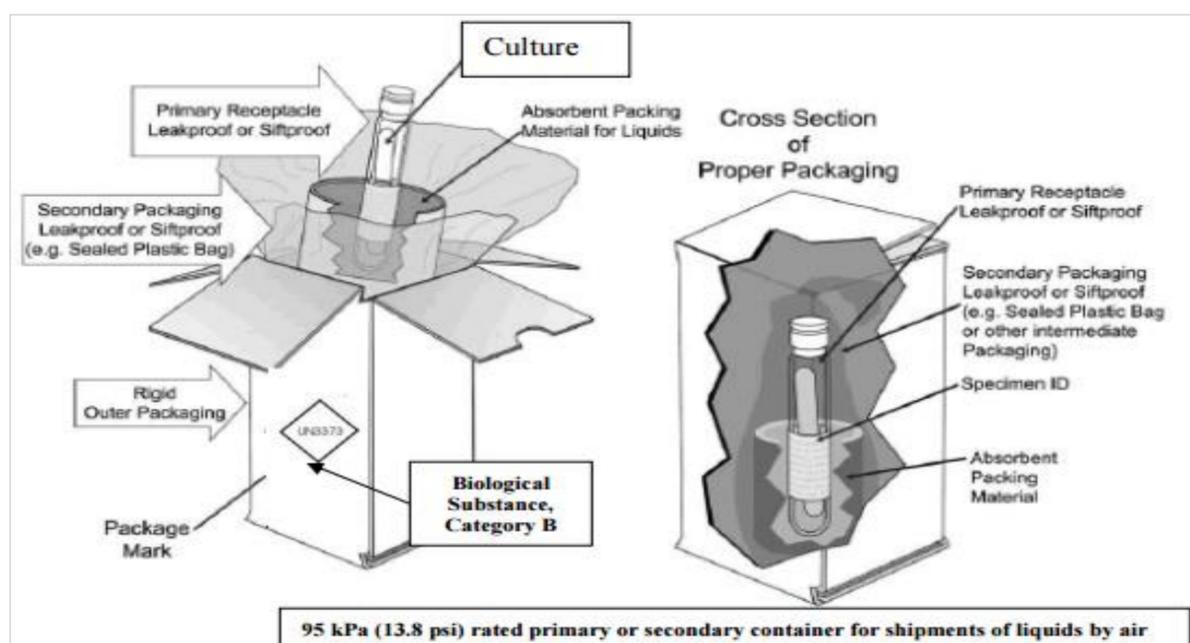
CONSIGNEE /DESTINATARIO:

.....
Biological substance
Category B UN 3373

NET QUANTITY: ml
..... one ml plastic ampoule

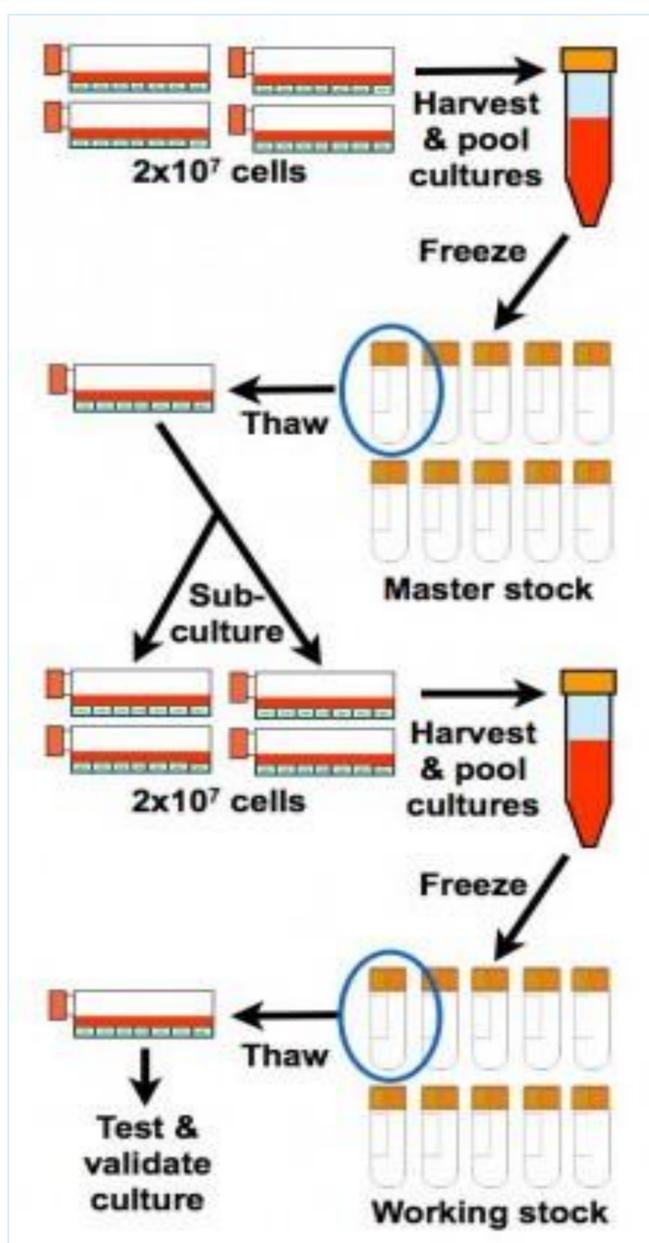
Packed in compliance with IATA
PI650

Responsible person: Dr. Barbara Parodi
Address: as shipper
Tel.: +39.010.5737474
Switchboard: +39.010.57371

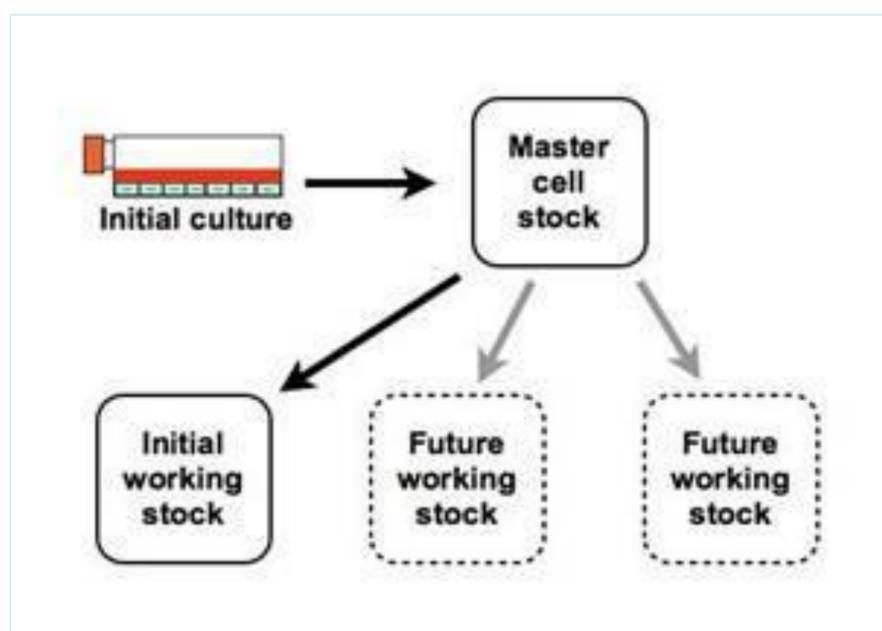


Master e working bank

- Le linee cellulari devono essere conservate in lotti omogenei, correttamente etichettati con nome, codice del lotto e data di congelamento, in vapori di azoto liquido
- questo permette di effettuare su ciascun lotto i controlli di qualità a campione, scongelando un'ampolla del lotto per verificare vitalità, identità, assenza di contaminazioni
- Quando si espande una linea cellulare è buona norma operare secondo le regole di master e working bank:
 - congelare al più presto una o più ampole di riserva, e procedere all'espansione fino ad ottenere il numero di cellule necessario per congelare il lotto «master»



- scongelare un'ampolla del lotto «master», effettuare i controlli di qualità ed espandere fino ad ottenere un numero di ampole sufficiente per il progetto (lotto «working»)
- quando il lotto è in esaurimento, scongelare una nuova ampolla del lotto «master» e procedere come sopra



Serial banking e backup

Cosa si intende con serial banking?

Scongelare un'ampolla di una linea cellulare, tenerla in coltura, magari per settimane o mesi, utilizzarla per il progetto e ricongelare quello che avanza (anche una sola ampolla), per usi futuri

Evitare il *serial banking*

Le cellule rimaste in coltura dopo gli esperimenti **devono essere eliminate** per evitare:

- aumento del numero di passaggi
- rischio di contaminazione
- perdita di caratteristiche chiave
- selezione di caratteristiche di crescita anormali
- modifiche genetiche e epigenetiche



Garantire il backup dei campioni

È buona regola conservare i lotti della linea cellulare in almeno due crio-contenitori distinti (backup) per limitare il danno in caso di emergenza, e predisporre una procedura operativa per la gestione delle emergenze nella sala crio-biologica



Autenticazione

Lo **scopo** dell'autenticazione è confermare o verificare l'identità di una linea cellulare, dimostrando che appartiene alla specie indicata e deriva dal donatore corretto.

Le cause di una scorretta identificazione possono essere:

- Un errore nell'applicazione delle GCCP⁶
- Linee cellulari ottenute da un collega in modo incontrollato
- Trasferimento accidentale di cellule da una bottiglia di terreno di coltura: utilizzare bottiglie dedicate
- Operare sotto cappa Biohazard contemporaneamente con due linee: evitare gli aerosol
- Etichettare erroneamente una fiasca di coltura o un'ampolla
- Scongelo dell'ampolla sbagliata
- Cellule del *feeder layer* mitoticamente attive
- Terreni di coltura condizionati preparati senza un'adeguata filtrazione



Mis-identification

Cross-contamination

Contaminazione è l'introduzione di materiale estraneo in una coltura cellulare

La cross-contaminazione si verifica quando il materiale estraneo è costituito da cellule di un'altra coltura, che possono anche essere di specie diversa

Le cellule a crescita rapida possono contaminare e progressivamente sostituire le cellule a crescita lenta

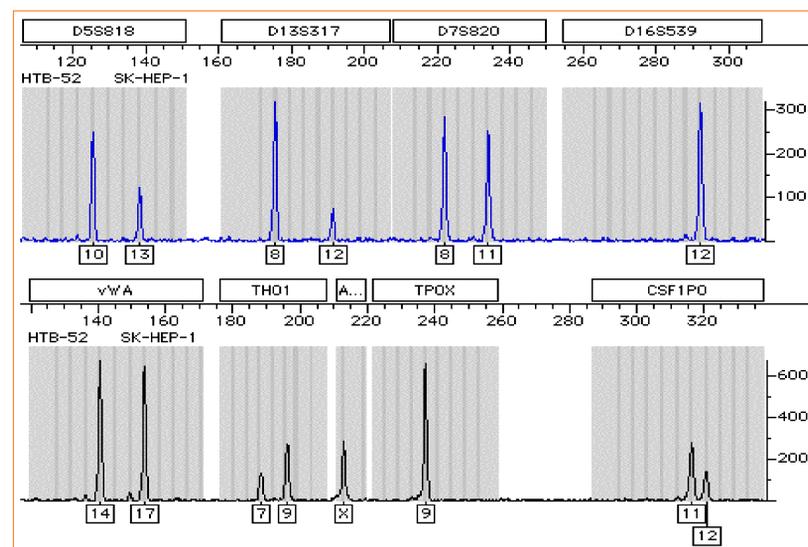
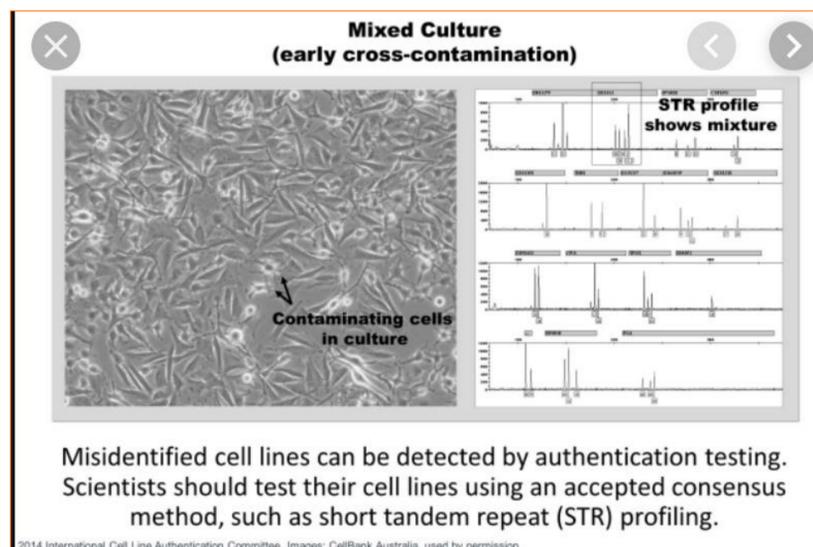
Come riconoscere e risolvere il problema⁹

Cellule umane: profilo STR

Cellule animali: cariotipo, tipizzazione del DNA mitocondriale (DNA barcode), confronto delle sequenze parziali con le sequenze genomiche complete quando disponibili

Profilo STR

Le principali **riviste scientifiche** hanno introdotto negli ultimi anni criteri restrittivi per gli autori in termini di autenticazione di linee cellulari: per la pubblicazione è necessario che ogni linea cellulare umana utilizzata sia corredata da un **certificato di autenticità** fornito da una struttura autorizzata, e diverse Banche cellule offrono il servizio di autenticazione di linee cellulari umane con profilo genetico STR secondo lo *Standard ANSI/ATCC* ¹⁰.



Il test prevede l'amplificazione mediante PCR multiplex di quindici loci STR più amelogenina con un set di primers. I prodotti sono analizzati simultaneamente con tecniche di rilevazione automatizzate e il risultato è un codice numerico linea-specifico altamente riproducibile (profilo STR).

I valori ottenuti possono essere analizzati e confrontati con i profili pubblicati sui database pubblici (es. Cell Line Integrated Molecular Authentication database ([CLIMA 2.1](#)¹¹ e Cellosaurus⁵).

Il profilo STR diventa parte integrante dell'identificativo della linea, a conferma dell'identità e della riproducibilità dei dati.

«L'evidenza suggerisce che circa un terzo delle linee cellulari usate nella ricerca siano scorrettamente identificate o cross-contaminate, rendendo molte conclusioni dubbie se non completamente sbagliate.» ¹²

«Se non stiamo usando ciò che pensiamo di usare, non stiamo testando le nostre ipotesi... Non sono sicuro di cosa stiamo facendo, ma non è scienza.»¹³

L'International Committee for Cell Line Authentication ([ICLAC](#)) è nato nel 2012 con l'obiettivo di dare visibilità al problema delle linee cellulari non correttamente identificate, di promuovere la consapevolezza da parte della comunità scientifica e di dare informazioni sui metodi efficaci per risolvere il problema⁹.

ICLAC mantiene un database di linee cellulari *mis-identified*, che comprende quasi 500 linee cellulari. Nel 24% dei casi la linea contaminante è la HeLa, ma 113 diverse linee utilizzate per migliaia di pubblicazioni anche in riviste scientifiche prestigiose **non hanno le caratteristiche dichiarate**. Questo causa un enorme spreco di tempo e denaro, ma soprattutto risultati della ricerca non affidabili, fuorvianti e non riproducibili.

ICLAC stimola le istituzioni di ricerca e le riviste scientifiche a pretendere dai ricercatori una maggiore attenzione alle Good Cell Culture Practices. Molte riviste hanno reso obbligatoria l'autenticazione.

International Cell Line Authentication Committee

Home Resources Databases Case Studies References About ICLAC Members Partners

L'ICLAC ha predisposto una check list per istituzioni, finanziatori e riviste scientifiche per la valutazione della qualità delle linee cellulari

Checklist linee cellulari per pubblicazioni e richieste di finanziamento ¹⁴	
La linea cellulare è presente nel registro ICLAC delle linee cellulari cross-contaminate o non correttamente identificate?	no
È stata effettuata l'autenticazione?	sì
Linee umane: è disponibile il profilo STR?	sì
È stato effettuato il test per micoplasma?	sì
La linea è stata fornita da una Banca cellule? È presente il codice di catalogo?	sì
È indicato il numero RRID della linea cellulare?	sì
Sono state fornite informazioni sufficienti per replicare gli esperimenti con la linea cellulare?	sì

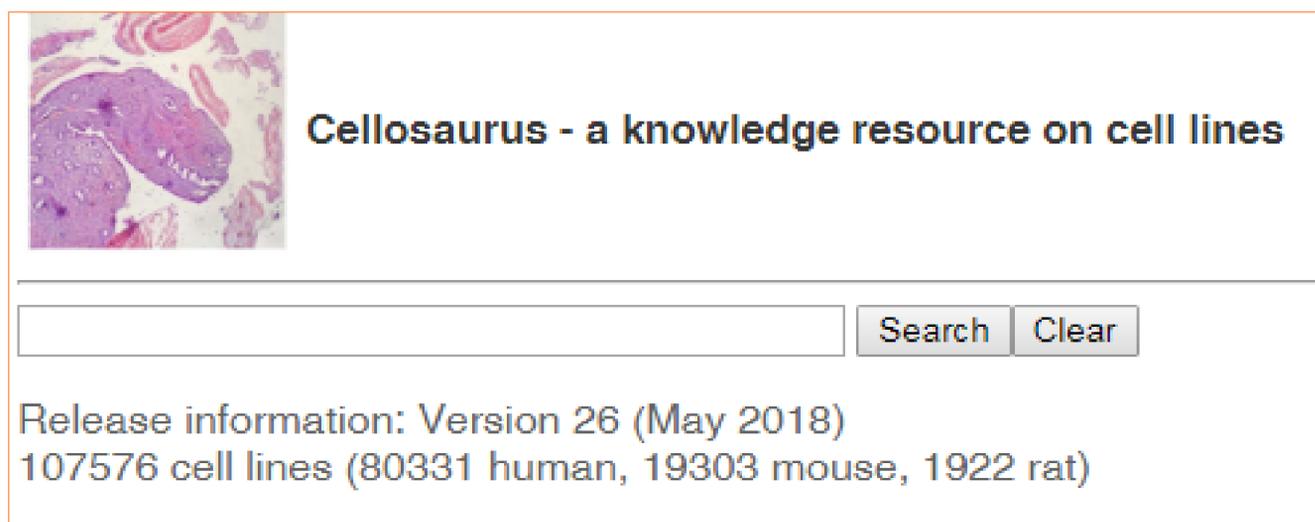
Useful Resources

- [ICLAC Register of Misidentified Cell Lines](#)
- [Advice to Scientists: Incorporating Authentication into Everyday Culture Practice](#)
- [Cancer Moonshot Letter](#)
- [Cell Line Checklist for Manuscripts and Grant Applications](#)
- [Cell Line Policy for Research Institutions](#)
- [Definitions](#)
- [Guide to Human Cell Line Authentication](#)
- [Match Criteria Worksheet for Human Cell Line Authentication](#)
- [Naming a Cell Line](#)
- [Resources for Authentication Testing Survey](#)
- [ICLAC Terms of Reference](#)

Banche di dati e di cellule

Cellosaurus e Clima

Cellosaurus⁵ è una risorsa di conoscenza online di linee cellulari sviluppata dallo Swiss Institute of Bioinformatics. Partecipa alla [Resource Identification Initiative](#) (RRID)¹⁵ e all'ICLAC e fornisce una vasta gamma di informazioni su più di 100.000 linee cellulari umane e animali, ottenute integrando oltre 70 database diversi. Il portale traccia le linee cellulari considerate problematiche dal database ICLAC e fornisce se disponibili i profili STR.



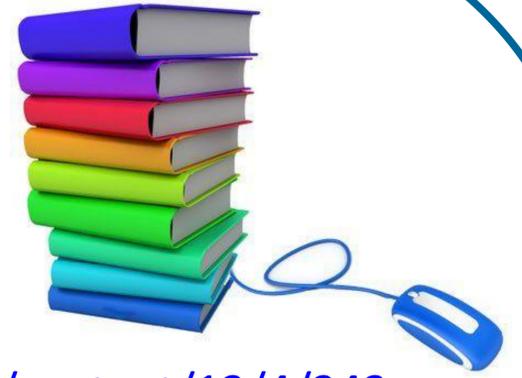
Anche il Cell Line Integrated Molecular Authentication database ([CLIMA 2.1¹¹](#)) permette di confrontare i profili STR con circa 5.000 profili pubblici.

Banche cellule

L'ATCC (USA) è la banca storica di materiale biologico, ma in Europa ci sono due grandi banche di linee cellulari: ECACC (UK) e DSMZ (DE). La Banca cellule ICLC del Centro di Risorse Biologiche del Policlinico di Genova, operativa dal 1994, è un riferimento per i ricercatori italiani per la fornitura di linee cellulari e offre, in collaborazione con la Medicina Legale, il servizio di autenticazione di linee cellulari umane.



Referenze e approfondimenti



1. Gey GO, et al. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12: 264-265, 1952 <https://cancerres.aacrjournals.org/content/12/4/243>
2. Gartler SM. Apparent HeLa Cell Contamination of Human Heteroploid Cell Lines. *Nature*, 217:750–751, 1968 <https://www.nature.com/articles/217750a0>
3. General Data Protection Regulation (GDPR) <https://gdpr-info.eu/>
4. ICLAC.org Naming a Cell Line <https://iclac.org/resources/cell-line-names/>
5. Bairoch A. The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. *J Biomol Tech.* 2018 Jul;29(2):25-38. doi: [10.7171/jbt.18-2902-002](https://doi.org/10.7171/jbt.18-2902-002).
6. ICLAC.org Guidelines for Good Cell Culture Practice <https://iclac.org/references/reading-guidelines/>
7. ICLAC.org Database of Cross-Contaminated or Misidentified Cell Lines <https://iclac.org/databases/cross-contaminations/>
8. IATA Packing Instruction 650 – Biological Substances, Category B (http://www.iata.org/NR/rdonlyres/9C7E382B-2536-47CE-84B4-9A883ECFA040/0/Guidance_Doc62DGR_50.pdf)
9. ICLAC.org Guide to Human cell line authentication. A simple and inexpensive step-by-step protocol. (2014). <https://iclac.org/resources/human-cell-line-authentication/>
10. ATCC® Standards Development Organization Designation: ASN-0002 Authentication of Human Cell Lines: Standardization of STR Profiling. ANSI/ATCC ASN-0002-2011 <https://webstore.ansi.org/standards/atcc/ansiatccasn00022011>
11. Romano P, et al. Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. *Nucleic Acids Research*, 37, Issue suppl_1, 2009, D925–D932 doi: [10.1093/nar/gkn730](https://doi.org/10.1093/nar/gkn730)
12. *Lancet Oncology*. Contamination of cell lines - a conspiracy of silence. Vol. 2, July 2001 DOI:[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00402-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00402-2)
13. Boatright J, The Great Big Clean-Up, *The Scientist*, sept. 2015 <https://www.the-scientist.com/features/the-great-big-clean-up-34920>
14. ICLAC.org Cell Line Checklist for Manuscripts and Grant Applications. <https://iclac.org/resources/cell-line-checklist/>
15. The Resource Identification Initiative: a cultural shift in publishing. *Brain and Behavior*. 2016; 6(1), e00417. doi: [10.1002/brb3.417](https://doi.org/10.1002/brb3.417)

